

Министерство науки и высшего образования РФ
Правительство города Севастополя
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»
Всероссийское гидробиологическое общество при Российской академии наук
Русское географическое общество
Паразитологическое общество при Российской академии наук

Изучение водных и наземных экосистем: история и современность

Международная научная конференция, посвящённая 150-летию
Севастопольской биологической станции —
Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского
и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий»

Тезисы докладов

13–18 сентября 2021 г.
Севастополь, Российская Федерация

Севастополь
ФИЦ ИНБЮМ
2021

Показатели неспецифического иммунного ответа и антиоксидантного статуса тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*) в условиях экспериментальной гипоксии

Андреева А. Ю., Кладченко Е. С., Кухарева Т. А., Водясова Е. А., Челебиева Э. С.,
Гостюхина О. Л.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», Севастополь, Россия

andreevaal@gmail.com

На протяжении последних десятилетий исследования в области иммунологии двустворчатых моллюсков сконцентрированы на изучении влияния факторов окружающей среды на базальный (нестимулированный) иммунный статус организма. Показано, что иммунитет моллюсков в значительной степени зависит от температуры окружающей среды, солёности воды и концентрации растворённого кислорода. С середины XX в. прибрежная гипоксия становится устойчивым феноменом Мирового океана, оказывающим негативное воздействие на физиологию водных организмов. Многие виды двустворчатых моллюсков интенсивно культивируются для употребления в качестве источников пищи. Эффективность выращивания двустворчатых моллюсков в культуре в значительной степени зависит от иммунного статуса организмов, поскольку этот фактор определяет устойчивость к заболеваниям. В основе иммунной системы двустворчатых моллюсков лежат механизмы неспецифического клеточного и гуморального ответов. При этом гемоциты, циркулирующие в гемолимфе, являются основными эффекторами клеточного иммунитета. В основе клеточного иммунного ответа лежит продукция гемоцитами цитотоксических агентов, и ведущую роль среди них играют активные формы кислорода (далее — АФК), которые, в свою очередь, могут оказывать повреждающее действие и на клетки моллюска. Нейтрализацию АФК в организме осуществляет антиоксидантный ферментный комплекс, в котором каталаза (далее — КАТ) и супероксиддисмутаза (далее — СОД) играют существенную роль.

В настоящей работе исследованы показатели клеточного иммунного ответа (уровень активных форм кислорода, интенсивность фагоцитоза) гемоцитов, клеточный состав гемолимфы и антиоксидантный статус в жабрах тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* в условиях ранжированной гипоксии.

Тихоокеанские устрицы (150 экз.) были получены с местной фермы (Севастопольская бухта, г. Севастополь) и акклиматизированы к лабораторным условиям в течение одной недели (концентрация растворённого кислорода 7,8–8,3 мг·л⁻¹; солёность 17,5–19,5 ‰; pH 8,0–8,4; температура (16 ± 1,2) °C). По окончании периода акклиматизации моллюсков разделили на три группы — контрольную (концентрация кислорода 7,8–8,3 мг·л⁻¹) и две группы гипоксии (концентрация кислорода 2,1 мг·л⁻¹). Гипоксические условия создавались путём барботажа морской воды в аквариуме газообразным азотом в течение 3 ч. Каждые 24 ч половина воды в аквариумах заменялась на свежую с заданной концентрацией кислорода. По окончании двух экспериментальных периодов (24 и 72 ч) у моллюсков отбирали образцы гемолимфы и жаберной ткани. Из гемолимфы выделяли гемоциты; из них готовили мазки, которые окрашивали по комбинированному методу Паппенгейма для идентификации клеток. Часть клеток инкубировали с частицами зимозана [Phagocytosis Assay Kit (Green Zymosan)] для определения интенсивности фагоцитоза согласно протоколу производителя. Уровень АФК в гемоцитах анализировали на основании флуоресценции клеток, окрашенных DCF-DA. Активность фагоцитоза у гемоцитов и содержание в них АФК опре-

деляли на проточном цитометре FC 500 (Beckman Coulter). В жаберной ткани проводили оценку активности ферментов КАТ и СОД согласно стандартным методикам, а также анализировали уровень экспрессии генов КАТ и СОД при помощи метода Real-Time PCR.

Гемолимфа устриц содержала три типа клеток: агранулоциты, гранулоциты и гиалиноциты. В условиях нормоксии в гемолимфе устриц доминировали агранулоциты, доля которых составляла $(50,4 \pm 11,6) \%$; доля гиалиноцитов и гранулоцитов — $(29,3 \pm 9,6)$ и $(20,3 \pm 2,0) \%$ соответственно. Гипоксия вызвала изменения в клеточном составе гемолимфы в зависимости от длительности воздействия. Доля агранулоцитов последовательно росла до $(71,1 \pm 1,2) \%$ в конце 72 ч инкубации. Доля гиалиноцитов достоверно сократилась до $(13,1 \pm 2,2) \%$. Число гранулоцитов не менялось в течение 24 ч гипоксии, а затем снизилось до $(15,8 \pm 2,3) \%$. Интенсивность фагоцитоза у гемоцитов устриц не менялась спустя 24 ч гипоксии, но имела тенденцию к снижению при длительном воздействии недостатка кислорода. В течение кратковременной гипоксии уровень АФК вырос у всех типов гемоцитов устриц, при этом у гранулоцитов их концентрация увеличилась вдвое. При длительном периоде гипоксии содержание АФК в гемоцитах снизилось в 3–5 раз во всех типах гемоцитов.

Активность КАТ в жабрах в условиях гипоксии сохранялась на уровне контроля вне зависимости от длительности воздействия, в то время как активность СОД достоверно возросла в 1,7 раза в конце 72-часового периода экспозиции. Уровень экспрессии СОД, напротив, вырос спустя 24 ч гипоксии более чем в 2 раза относительно контроля и продолжил расти по окончании 72 ч воздействия. Относительный уровень экспрессии КАТ имел тенденцию к росту при воздействии гипоксии, однако различия в показателях были недостоверны.

Таким образом, кратковременный период гипоксии оказал стимулирующее действие на иммунную систему устриц. При этом антиоксидантный комплекс продемонстрировал развитие компенсаторной реакции на продукцию АФК устрицами. Глубокая гипоксия оказала ингибирующее действие на показатели клеточного иммунитета устриц, а также способствовала развитию у них окислительного стресса.